

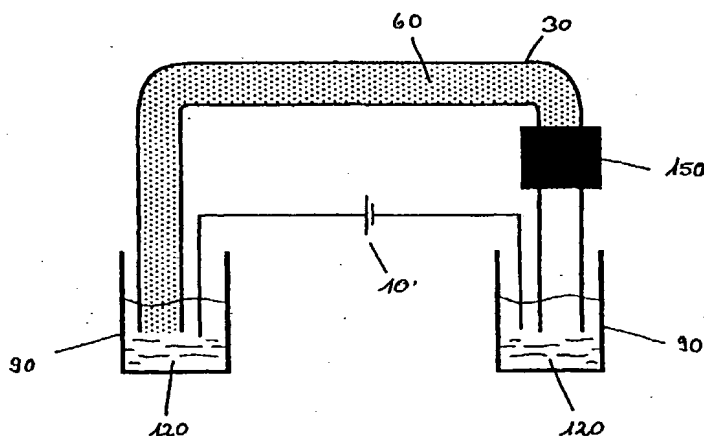
PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 30/48, 27/447	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50886 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. August 2000 (31.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01391 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Februar 2000 (21.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 07 296.5 22. Februar 1999 (22.02.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): UNGER, Klaus [DE/DE]; Am Alten Berg 40, D-64342 Seeheim (DE). BOOS, Karl-Siegfried [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64271 Darmstadt (DE). LUBDA, Dieter [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64271 Darmstadt (DE). MUS- CATE-MAGNUSSEN, Angelika [DE/DE]; Prahls Strasse 1-3, D-22765 Hamburg (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	

(54) Title: USE OF SUPPORTING MATERIAL HAVING REVERSED PHASES IN CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON UMKEHRPHASEN-TRÄGERMATERIAL IN DER KAPILLAR- ELEKTROCHROMATOGRAPHIE



(57) Abstract

The invention relates to the use of supporting material for carrying out capillary electrochromatography, whereby the supporting material based on a base material containing hydroxyl groups has reversed phases which are restricted to the inner surfaces of porous particles, and these reversed phases are comprised of fatty acid esters. The invention also relates to capillary columns which are suited for carrying out the inventive use of reversed phase supporting material in capillary electrochromatography.

(57) Zusammenfassung

Die Verwendung von Trägermaterial für die Kapillar-Elektrochromatographie wird offenbart, wobei das Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigem Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist, und diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen. Weiterhin werden für diese Verwendung geeignete Trennkapillaren offenbart.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	IS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NR	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire			PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Umkehrphasen-Trägermaterial
in der Kapillar-Elektrochromatographie

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Umkehrphasen-Trägermaterial in der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC).

Im allgemeinen sind Analysenmethoden im günstigsten Fall selektiv; nur wenige, wenn überhaupt, sind jedoch wirklich spezifisch. Folglich ist im Rahmen einer Analyse die Abtrennung des Analyten von störenden Begleitsubstanzen unumgänglich.

In chromatographischen Trennungen wird die Probe in einer mobilen Phase gelöst, bei der es sich z.B. um ein Gas, eine Flüssigkeit oder ein überkritisches Fluid handeln kann. Die mobile Phase wird durch eine mit ihr nicht mischbare stationäre Phase bewegt, die sich z.B. in einer Säule befindet oder an einer festen Oberfläche fixiert ist. Die beiden Phasen werden so gewählt, dass sich die Probenkomponenten in verschiedenem Maße zwischen der mobilen und stationären Phase verteilen. Die Komponenten, die von der stationären Phase in starkem Maße zurückgehalten werden, bewegen sich nur langsam mit der mobilen Phase weiter. Demgegenüber bewegen sich die Komponenten, die nur schwach von der stationären Phase zurückgehalten werden, schnell. Aufgrund dieser Unterschiede trennen sich die Probenkomponenten in diskrete Banden auf.

Ein Chromatographiekonzept, das die Vorteile der Kapillarflüssigkeitschromatographie (z.B. HPLC) und der Kapillarelektrophorese (CE) verbindet, ist die sogenannte Kapillar-Elektrochromatographie (CEC). Im wesentlichen kann CEC als Hybrid aus HPLC und CE angesehen werden (Colon *et al.*, Analytical Chemistry News & Features 1995; August 1, 461A-467A). Wie in der HPLC werden die Komponenten einer Probe durch unterschiedliche Verteilung zwischen einer stationären und einer

mobilen Phase aufgetrennt. Zusätzlich wird aber, wie in der CE, durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt. Die Trennungen können isokratisch oder mit einem Gradienten durchgeführt werden. Die Säulen sind bevorzugt mit Kieselgelpartikeln gefüllt, die typischerweise Partikeldurchmesser im Bereich von 1 bis 5 µm haben.

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Trennung von anionischen, kationischen und neutralen Molekülen. Allerdings besteht ein großes Problem in der Analyse komplexer, insbesondere biologischer Proben. Diese, wie z.B. hämolysiertes Blut, Plasma, Serum, Milch, Speichel, Fermenterbrühe, Urin, Überstände von Zellkultur-, Lebensmittel- und Gewebehomogenaten oder Naturstoffextrakte, enthalten neben dem Analyten einen großen Anteil an Matrixkomponenten, wie Proteine und Salze.

Proteine und andere Makromoleküle werden z.B. durch hohe Anteile von organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase ausgefällt oder durch Restsilanolgruppen an der Oberfläche eines chromatographischen Trägers unspezifisch, irreversibel gebunden oder denaturiert. Sie blockieren bei Verwendung einer porösen stationären Phase den Zugang zu den Poren und verringern damit die Anzahl der chromatographischen Adsorptionszentren. Durch den damit verbundenen verringerten Stoffaustausch zwischen stationärer und mobiler Phase führen diese Vorgänge zu einem Kapazitäts- und Selektivitätsverlust der Säule. Nichtspezifische Adsorption führt darüber hinaus zu Schwankungen des elektroosmotischen Flusses und zu nicht reproduzierbaren Retentionszeiten der Analyten. In allen Fällen wird die CEC-Säule schwer geschädigt oder unbrauchbar gemacht. Daher ist es notwendig, diese Matrixkomponenten vor der CEC-Analyse aus der Probe zu entfernen.

Diese Problematik wiegt umso schwerer, da sie Bestimmungen betrifft, die in großer Anzahl durchgeführt werden: z.B. Therapiekontrolle, Bestimmung von körpereigenen Substanzen oder auch das Hochdurchsatzscreening nach potenziellen pharmakologischen Wirkstoffen, insbesondere unter Verwendung von Naturstoffextrakten.

Gängige Probenaufbereitungsverfahren sind z.B. Kartuschenverfahren oder die Verwendung von Vorsäulen, die vorzugsweise mit Kieselgelpartikeln gefüllt sind, wobei die Elution des Analyten bevorzugt durch Flüssigdesorption (HPLC) erfolgt. Allerdings sind die notwendigen Probenvorbehandlungsschritte oft zeit-, kosten- und arbeitsintensiv und führen durch den notwendigen Transfer des Analyten auf eine Trennsäule zu einer Volumenvergrößerung der Probe, die zu einem Verlust an Selektivität und Empfindlichkeit des Trennverfahrens führt.

Boos et al. (LC-GC 1997,15, 602-611; LC-GC 1996,14, 554-560) beschreiben ein Trägermaterial auf Alkyl-Diol-Silika-Basis (ADS), das quantitative Abtrennung von Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen gewährleistet. Es zeichnet sich durch eine für Biomoleküle inerte Oberfläche aus und ist in den Poren mit Alkylgruppen belegt. Die Porengröße ermöglicht kleinen Zielmolekülen (Analyten) Zugang, während die großen Matrixmoleküle ausgeschlossen bleiben. Dieses Material wurde speziell für HPLC-Analysen entwickelt.

Die Verfahren der Kapillar-Elektrochromatographie und der HPLC unterscheiden sich insbesondere durch die in der CEC auftretenden elektroosmotischen Kräfte erheblich voneinander. Für die HPLC geeignete Materialien und Bedingungen sind somit nicht einfach auf das Verfahren der CEC zu übertragen (Colon et al. ,1997, Analytical Chemistry & Features, August 1).

Daher war es um so überraschender, dass die Verwendung von Träger-

material für die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC), wobei das Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist, und dass diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen, in der Kapillar-Elektrochromatographie eine im wesentlichen quantitative Abtrennung des Analyten von anderen Probenkomponenten, insbesondere Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen (Probenmatrix) der Probe ermöglicht.

Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Trägermaterial für die Kapillar-Elektrochromatographie, wobei das Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist, und wobei diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem eine Kapillare für die Kapillar-Elektrochromatographie gefüllt mit einem Trägermaterial, wobei das in der Kapillare befindliche Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist und diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials in der CEC ermöglicht es, den Analyten von anderen Komponenten der Probe zu trennen, ohne diesen zu verdünnen. Bei der erfindungsgemäßen Verwendung des Trägermaterials bleibt auch nach wiederholter Injektion komplexer Proben, insbesondere von serum- und zellkulturmedien-haltigen Proben, die Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Säule erhalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials erlaubt in einer weiteren Ausführungsform sogar die kombinierte Probenaufbereitung und -trennung von komplexen Proben auf einer einzigen CEC-Säule. Diese ist in Bezug auf Trennleistung, Empfindlichkeit, Signal-zu-Rausch-Verhältnis, Selektivität, Lebensdauer der Säule und Kosten der einer auf getrennten Säulen durchgeführten Probenaufbereitung und -trennung gleichgestellt oder sogar überlegen. Dies ermöglicht erstmals den Einsatz eines solchen Systems in Hochdurchsatz-Verfahren, wie z.B. dem Hochdurchsatz-screening nach potenziellen pharmakologisch aktiven Substanzen.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials zeichnet sich somit insgesamt durch folgende Eigenschaften aus:

- es besteht die Möglichkeit der wiederholten direkten Injektion unbehandelter Proben, insbesondere biologischer Proben auf einer CEC-Säule,
- die Proteinmatrix wird quantitativ entfernt,
- der Analyt kann am oberen Rand der Säule aufkonzentriert und unabhängig von der Matrix quantitativ ab- und aufgetrennt werden,
- hohe Trennleistung, Empfindlichkeit, Genauigkeit, sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis,
- hohes Maß an Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Trennung in der Säule,
- automatischer Betrieb möglich,
- hohe Anzahl an Analysendurchgängen, kontinuierlicher Betrieb der Säule,
- geringe Kosten pro Analyse.

Vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Verwendung in einem CEC-Verfahren zur Probenaufbereitung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten,

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Transferpuffers eluiert wird.

Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung in einem CEC-Verfahren zur kombinierten Probenaufbereitung und Trennung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten,

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Elutionspuffers aufgetrennt und eluiert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt nicht nur die Probenmatrix abzutrennen, sondern auch den Analyten aufzukonzentrieren; experimentelle Einzelheiten sind in Beispiel 6 offenbart. Unter Verwendung dieser Variante der vorliegenden Erfindung wird eine Aufkonzentration des Analyten um einen Faktor zwischen 10 und 1000 erreicht.

Zur genauen Charakterisierung der Zusammensetzung des Analyten sowohl qualitativ als auch quantitativ ist es in einer bevorzugten Ausführungsform möglich, im Anschluss an Trennung und/oder Elution verschiedene spektrometrische und spektroskopische Analysenverfahren durchzuführen. So wird z.B. im Ausführungsbeispiel 1 die UV-Detektion eingesetzt.

Es kann aber ebenfalls bevorzugt sein, die Analytfraktionen im Anschluss an die Trennung einem weiteren Säulensystem zur weiteren Trennung zuzuführen.

CEC-Vorrichtungen, die für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt; gleiches gilt für periphere Einrichtungen, wie z.B. Spannungsversorgungsvorrichtungen, Thermostasier-einrichtungen, Detektionsvorrichtungen, Trennkapillaren.

Für die CEC benutzte Trennkapillaren weisen typischerweise Innendurchmesser zwischen 20 und 300 μm auf, wobei die Untergrenze durch die Handhabbarkeit, die Obergrenze durch die Möglichkeit begrenzt wird, die durch den Stromfluß entstehende joulesche Wärme abzuleiten. Die Länge derartiger Kapillaren beträgt üblicherweise wenige Zentimeter bis zu ca. 50 cm, wobei die Obergrenze wiederum durch die Handhabbarkeit und auch durch die resultierende Analysenzeit begrenzt ist, da bei der Kapillarelektrochromatografie der lineare Fluß begrenzt ist. Die zur Füllung der Trennkapillaren üblichen partikulären Trägermaterialien weisen typischerweise Außendurchmesser von weniger als 20 μm , insbesondere von 1 bis 5 μm auf. Das Sorbensbett wird üblicherweise beidseitig durch Fritten begrenzt, wobei die Fritten auch durch Ansintern von Sorbenspartikeln erzeugt werden können.

Die erfindungsgemäß verwendeten Trennmaterialien, die auf den inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufwei-

sen, und deren Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen, besitzen Mesoporen, deren Weite typischerweise im Bereich von 2 bis 50 nm liegt, wie es für die Trennung von niedermolekularen Analyten üblich ist. Die Fettsäurereste besitzen in Abhängigkeit vom gewünschten Grad an Lipophilie 2 bis 24 Kohlenstoffatome. Als Basisträger sind hydroxylgruppenhaltige Materialien wie Silicagel, poröses Glas oder organische Polymere geeignet. Die Herstellung derartiger Trennmaterialien ist in DE 41 30 475 und EP 0 537 461 offenbart.

Weitere Ausführungsformen der Vorrichtung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Abbildungen erläutert.

Abbildung 1 zeigt ein CEC-Säulensystem, das aus einer einzelnen Säule zur Probenaufbereitung und/oder Trennung besteht.

Abbildung 2 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin.

Abbildung 3 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin.

Abbildung 4 zeigt das Elektropherogramm von Nadolol.

Abbildung 5 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain.

Abbildung 6 zeigt das Elektropherogramm von Hydrocortison.

Abbildung 7 zeigt das Elektropherogramm von Diphenylsulfon.

Abbildung 8 zeigt das Elektropherogramm von Diphenylsulfon mit einer Aufkonzentrierung des Analyten um den Faktor 10.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der Vorrichtung ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine CEC-Säule (30), die mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60) gepackt ist, taucht mit beiden Enden in Behälter

(90) mit mobiler Phase (120) ein. Die Spannungsquelle (10) dient zum Anlegen einer Spannung zwischen beiden Enden der Säulen. Die Spannung ermöglicht die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses in der Säule. Zusätzlich kann noch eine Vorrichtung zur Beaufschlagung der Behälter mit Druck angebracht werden. Das Anlegen von Druck gleichmäßig an beiden Säulenenden wirkt einer Ausgasung der Pufferlösungen und somit der Bildung von Luftblasen in der Säule entgegen. Ein Säulenende ist zur Aufnahme der Probe ausgebildet. Eine Wechsellvorrichtung ermöglicht das Wechseln der Behälter (90) und somit den Austausch bzw. die Anpassung der Pufferlösungen (120) an den Verfahrensschritt. Durch Anbringen beispielsweise, wie in Abbildung 1 skizziert, eines Detektors (150) direkt auf der Säule kann der Analyt direkt detektiert und analysiert werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Vorrichtung ist es bevorzugt, dass das Säulensystem aus mindestens einer CEC-Säule zur Probenaufbereitung und mindestens einer CEC-Säule zur Trennung des Analyten besteht, die miteinander über ein Kapillarsystem verbunden sind, wobei dieses Kapillarsystem in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mindestens einen Auslass aufweist, über den die Probenmatrix entfernt werden kann. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, eine CEC-Säule (30) nur zur Probenaufbereitung zu verwenden. Es ist auch möglich, den Analyten nach Abtrennung der Probenmatrix auf andere Analyse- bzw. Trennsysteme zu überführen.

Die Vorrichtung kann ebenfalls eine Kopplung des Säulensystems an mindestens einen Detektor, insbesondere Massenspektrometer und/oder Lichtstreuendetektor oder sonstigen optischen Detektor und/oder elektrochemischen Detektor (150), vorsehen.

Abbildung 2 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5 μm LiChrospher®

ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 3 zeigt das Elektropherogramm von Digitoxigenin, welches durch Anwendung erfindungsgemäßen Einsatz der Trägermaterialien von BSA (Rinderserumalbumin) getrennt wurde. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5 µm LiChrospher® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 4 zeigt das Elektropherogramm von Nadolol. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 5 µm LiChrospher® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 2.

Abbildung 5 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 2 µm LiChrospher® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 3.

Abbildung 6 zeigt das Elektropherogramm von Hydrocortison. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 2 µm LiChrospher® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 240 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 7 zeigt das Elektropherogramm von Diphenylsulfon als Kontrolle zum Aufkonzentrierungsversuch in Abbildung 8. Die Durchführung

erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 2 μm LiChrosper® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 μm . Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 5.

Abbildung 8 zeigt das Elektropherogramm von Diphenylsulfon mit einer Aufkonzentrierung des Analyten um den Faktor 10. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit 2 μm LiChrosper® ADS-C18 Teilchen (Porengröße 6 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 μm . Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 6.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, dass ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt. Außerdem ist die Offenbarung der korrespondierenden Anmeldung DE 199 07 296.5, eingereicht am 22.02.1999, soweit sie sich auf Trägermaterialien bezieht, die auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweisen, und wobei diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen, durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

Ausführungsbeispiel 1:*Trennung von Digitoxigenin in Gegenwart und Abwesenheit von BSA*Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS-C18 der Firma Merck Darmstadt gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5 µm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micrometrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat.

Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat.

Die Kontrollösung enthielt Digitoxigenin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 0.3 mg/ml in H₂O.

Die Probenlösung enthielt 1 mg/ml Digitoxigenin und 4 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin, Sigma Deisenhofen) in H₂O.

Vorrichtung

Zur Durchführung der Trennung von Digitoxigenin wurde die in Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung eingesetzt. Die mit LiChrospher® ADS-C18 gepackte Säule tauchte mit je einem Ende in Behälter zur Aufnahme von

Pufferlösung ein. Mit Hilfe einer Spannungsquelle (10) wurde eine Spannung zwischen beiden Enden der Säule angelegt.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde bei 15°C in 2 Stufen durchgeführt:

1. Die CEC-Säule wurde zunächst 40 min mit Waschpuffer äquilibriert. Während dieses Vorganges wurde eine Spannung von -5 kV angelegt und zur Verhinderung der Luftblasenbildung wurden beide Behälter mit einem Druck von 10 bar beaufschlagt. Die Stabilität der Säule wurde währenddessen durch Messung des Stroms und der UV-Absorption (bei 210 nm) kontrolliert.
2. Die 2. Äquilibrierungsphase dauerte 15 min, wobei eine Spannung von -15 kV und ein Druck von 10 bar angelegt wurden. Der Strom und die UV-Absorption wurden ebenfalls kontrolliert.

Nach Abschluss der 2. Phase waren der Strom und die UV-Absorption stabil.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15 °C temperiert.

Digitoxigenin

Die Probe (Digitoxigenin 0.3 mg/ml in H₂O) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5 kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Nach 9.5 Minuten wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Digitoxigenin wurde nach 12.7 min eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Digitoxigenin in Anwesenheit von BSA

Die Probe (1 mg/ml Digitoxigenin und 4 mg/ml BSA jeweils in H₂O) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5 kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Durch Aufbringen des Waschpuffers wird anschließend die Probe bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beiden Enden der Säule von 10 bar gewaschen und somit das BSA entfernt. Nach 10 Minuten wurde der Waschpuffer gegen einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Digitoxigenin wurde nach 12.6 min eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 2:

Trennung von Nadolol

Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS-C18 der Firma Merck Darm-

stadt gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5 μm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micrometrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 10 mM Ammoniumacetat.

Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 10 mM Ammoniumacetat.

Die Lösung enthielt Nadolol (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 0.3 mg/ml in H_2O .

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt.

Trennung

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Nadolol (1 mg/ml) wurde elektrokinetisch unter Anlegen einer Spannung von -5 kV für 3 sec geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinde-

zung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sog. Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Durch Aufbringen des Waschpuffers wird anschließend die Probe bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beiden Enden der Säule von 10 bar gewaschen und somit das BSA entfernt. Nach 10 Minuten wurde der Waschpuffer gegen einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Nadolol wird nach 13,99 min eluiert. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 3:

Trennung von Benzocain in Humanplasma

Verwendete Materialien

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS C18-Teilchen gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 2 µm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micro-metrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, pH 4,7.

Die Probenlösung bestand aus Humanplasma dotiert mit 0,5 mg/ml Benzocain.

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde bei 15°C in 2 Stufen durchgeführt:

1. Die Säule wurde zunächst mit Trennpuffer äquilibriert. Während dieses Vorgangs fand im Abstand von 5 min jeweils eine stufenweise Erhöhung der Spannung in 5 kV Schritten von -5 kV auf -20 kV statt. Dabei war der Inletpufferbehälter mit einem Druck von 5 bar beaufschlagt. Dann wurden beide Puffergefäße mit 10 bar Druck beaufschlagt und eine Spannung von -15 kV angelegt. Die Stabilität der Säule wurde währenddessen durch Messung des Stroms und der UV-Absorption (210 nm) kontrolliert.
2. Die 2. Äquilibrierungsphase erfolgte in Waschpuffer und dauerte 12 min. Dabei wurde eine Spannung von -15 kV und an beiden Pufferbehältern ein Druck von 10 bar angelegt. Der Strom und die Spannung wurden ebenfalls kontrolliert.

Nach Abschluss der 2. Phase waren der Strom und die UV-Absorption stabil.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von - 5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 7,7 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Das Benzocain eluierte bei 12,37 min. Das Elektropherogramm ist in Abbildung 5 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 4:

Trennung von Hydrocortison in Humanserum

Verwendete Materialien

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS C18-Teilchen gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 2 µm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micrometrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40 % Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, pH 4,7.

Die Probenlösung bestand aus Humanserum dotiert mit 0,5 mg/ml Hydrocortison.

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 3

Trennungen

Die Trennung erfolgte wie in Anwendungsbeispiel 3 beschrieben.

Das Hydrocortison eluierte bei 10,10 min. Das Elektropherogramm ist in Abbildung. 6 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 5:

Trennung von Diphenylsulfon in serumhaltiger Salzlösung

Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8,3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS-C18 Teilchen gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 2 µm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micrometrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, pH 4,7.

Die Probenlösung bestand aus 0,1 mg/ml Diphenylsulfon in 250 µl/ml Fötale Kälberserum in Hanks Balanced Salt Solution.

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 3 durchgeführt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5 kV über 3 s auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 7,7 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Das Diphenylsulfon eluierte bei 9,610

min und hatte eine Peakfläche von 85,5 mAU*s. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 7 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 6:

Zehnfache Aufkonzentrierung und anschließende Trennung von Diphenylsulfon in serumhaltiger Salzlösung

Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit LiChrospher® ADS-C18 Teilchen gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 2µm und eine Porengröße von 6 nm.

Die Korngrößenbestimmung wurde mit dem Malvern Mastersizer durchgeführt. Die Messung des Porendurchmessers erfolgte mit dem Micrometrics ASAP 2400 Gerät. Der Porendurchmesser wurde durch Bestimmung der Desorption oder Adsorption erhalten.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 60% Acetonitril, 40% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, pH 4,7.

Die Probenlösung bestand aus 0,01 mg/ml Diphenylsulfon in 250 µl/ml Fötales Kälberserum in Hanks Balanced Salt Solution.

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 1.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 3 durchgeführt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 30 sec auf der Säule aufkonzentriert. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 7,7 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Das Diphenylsulfon eluierte bei 9,805 min und einer Fläche von 84 mAU*sec. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 8 dargestellt.

Ansprüche

1. Verwendung von Trägermaterial für die Kapillar-Elektrochromatographie, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist, und dass diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen.
2. Kapillare für die Kapillar-Elektrochromatographie gefüllt mit einem Trägermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass das in der Kapillare befindliche Trägermaterial auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basismaterial auf die inneren Oberflächen von porösen Partikeln beschränkte Umkehrphasen aufweist und diese Umkehrphasen aus Fettsäureresten bestehen.

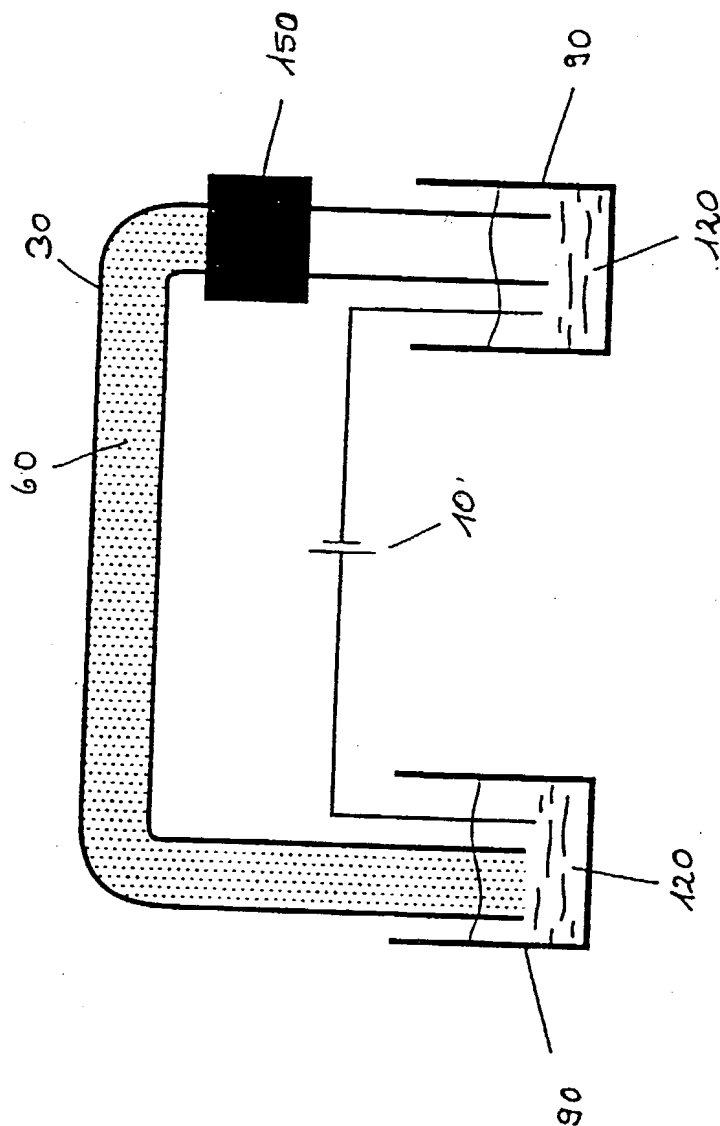


Abbildung 1

Abbildung 2

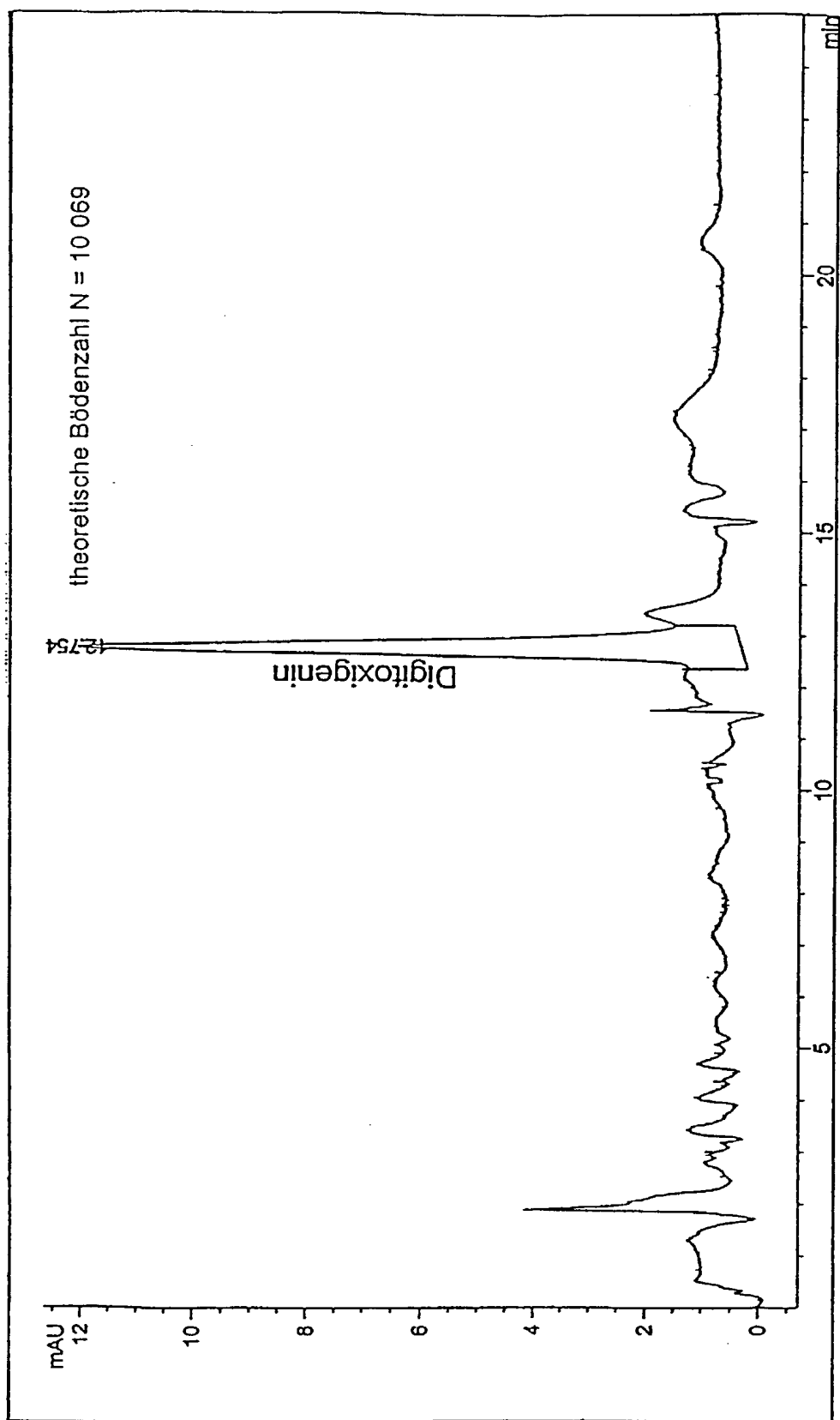


Abbildung 3

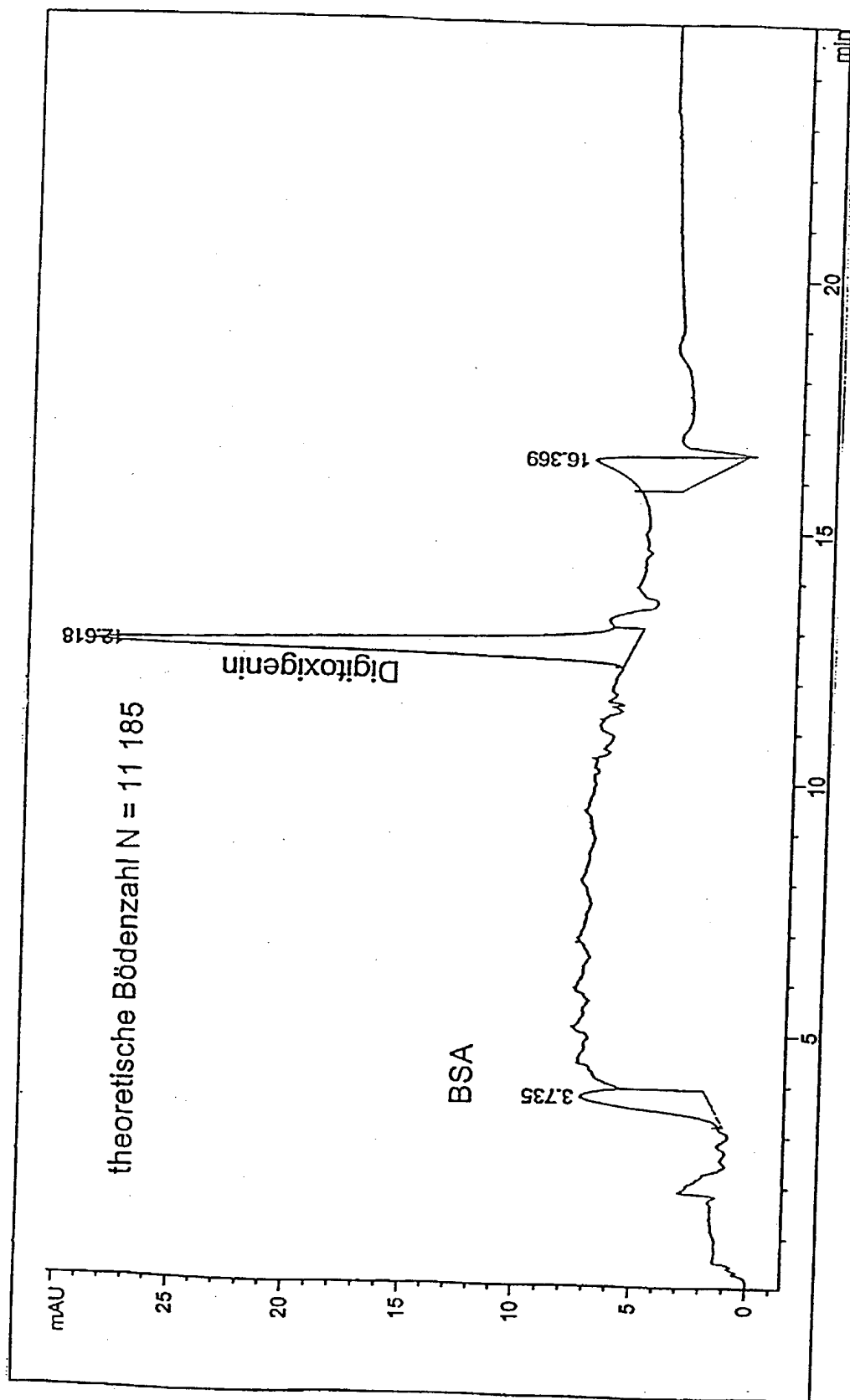


Abbildung 4

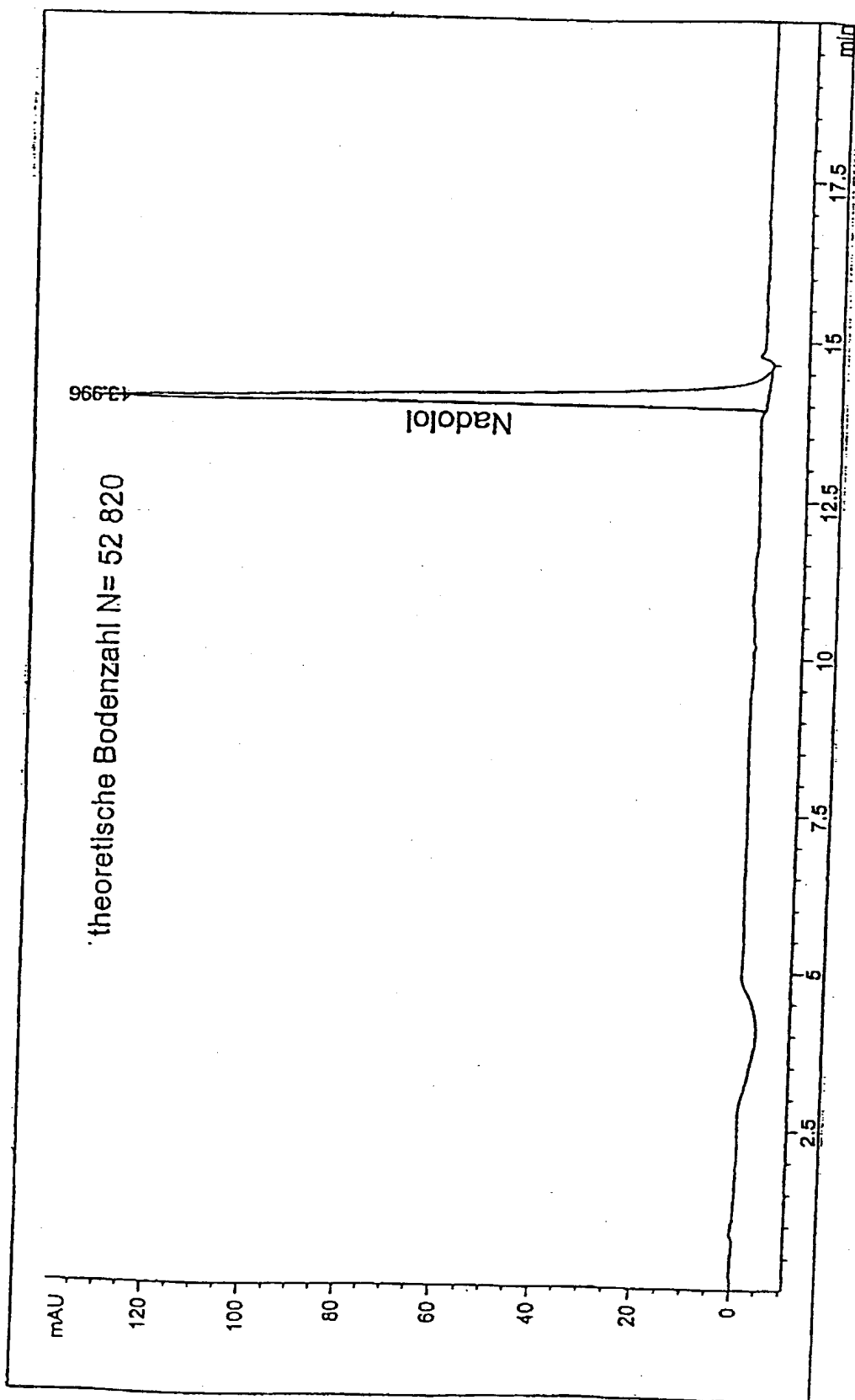


Abbildung 5

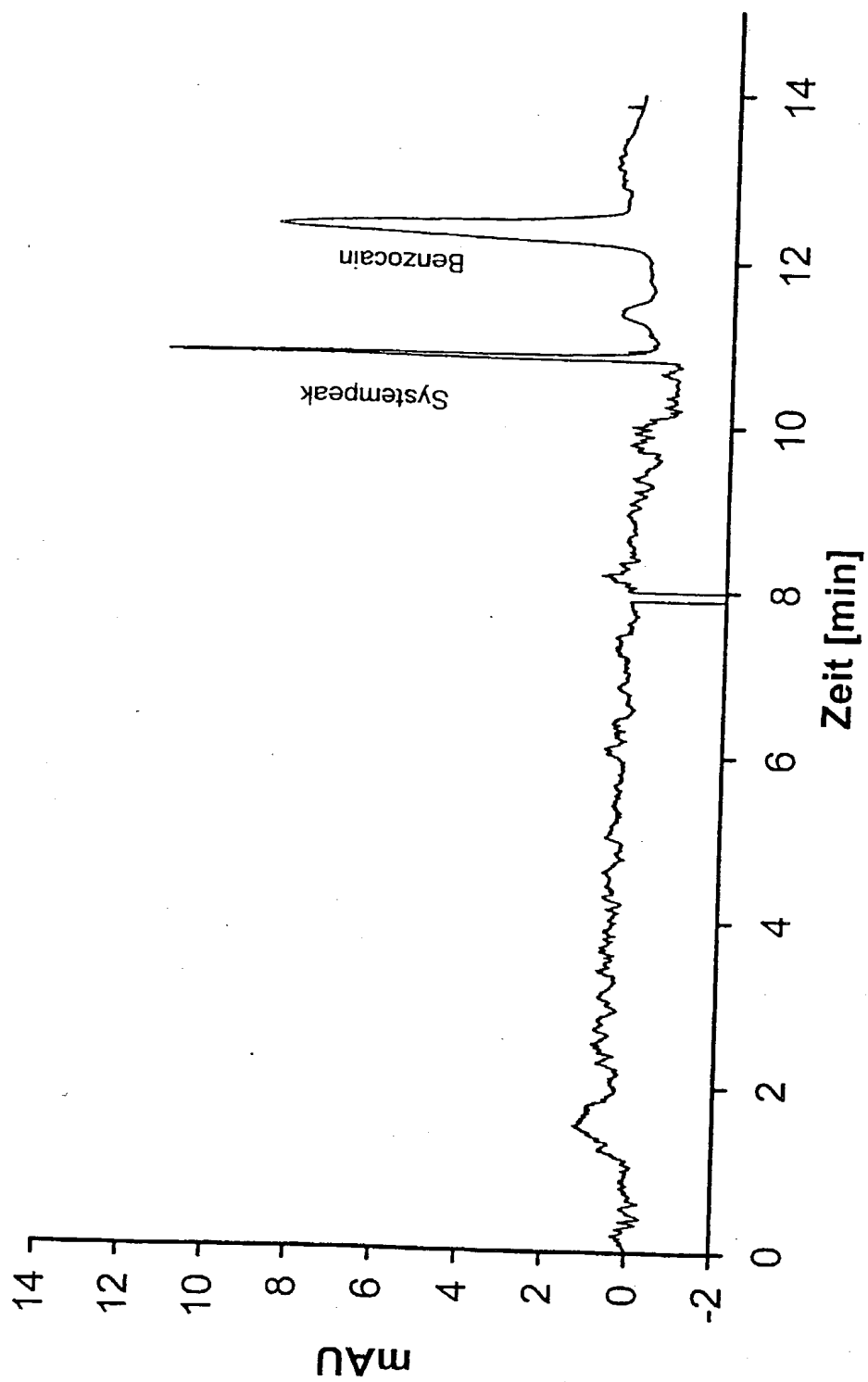


Abbildung 6

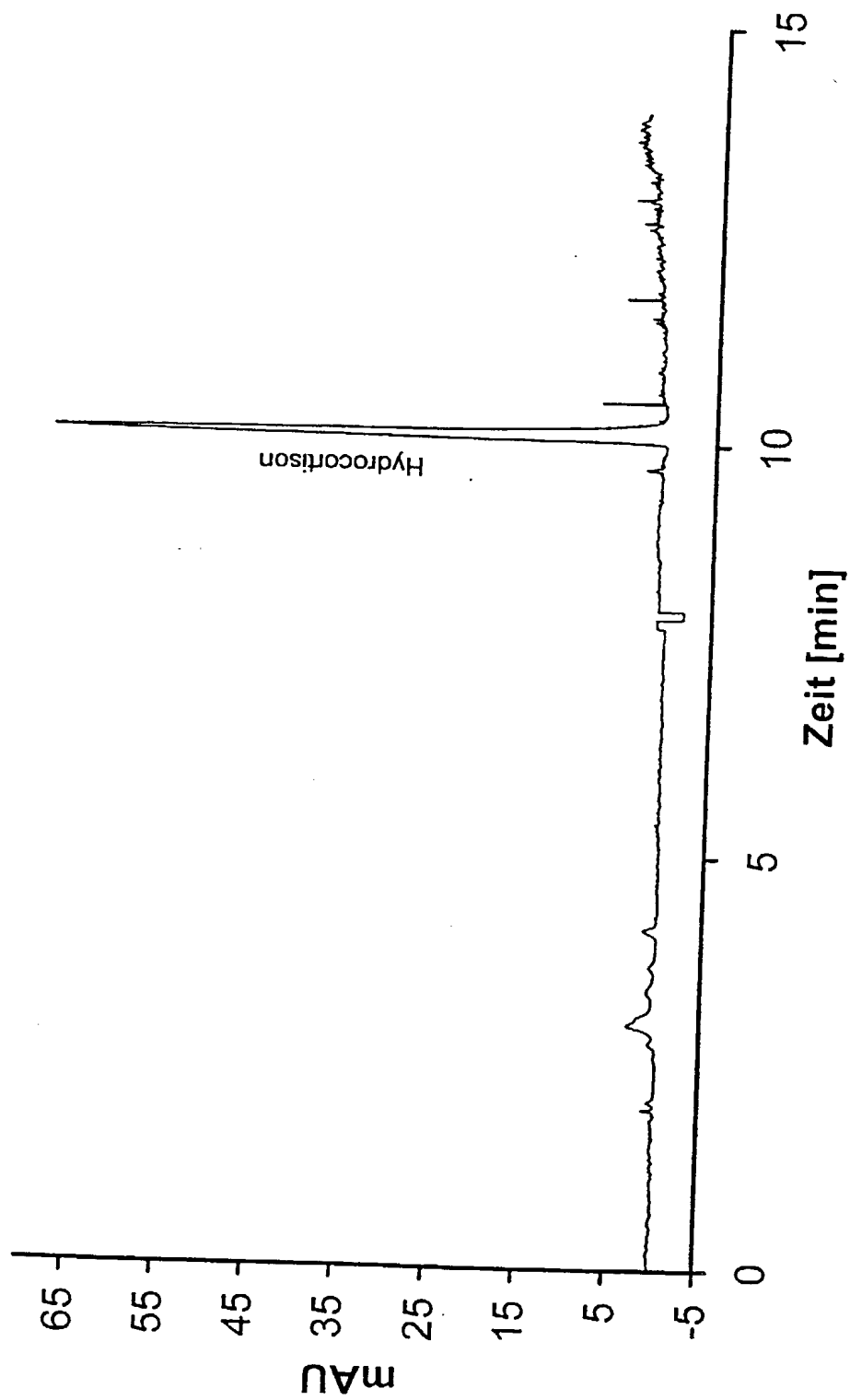
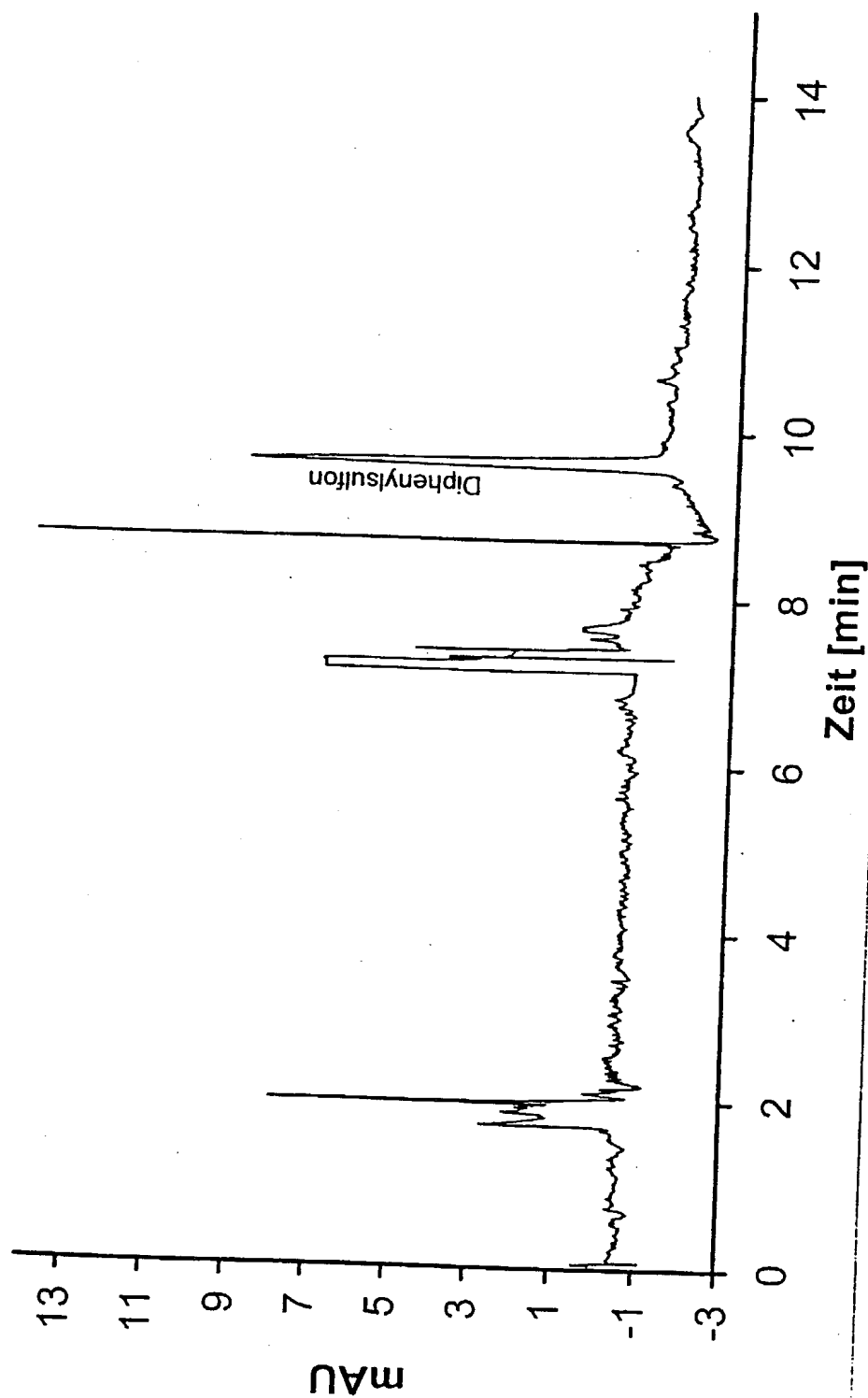
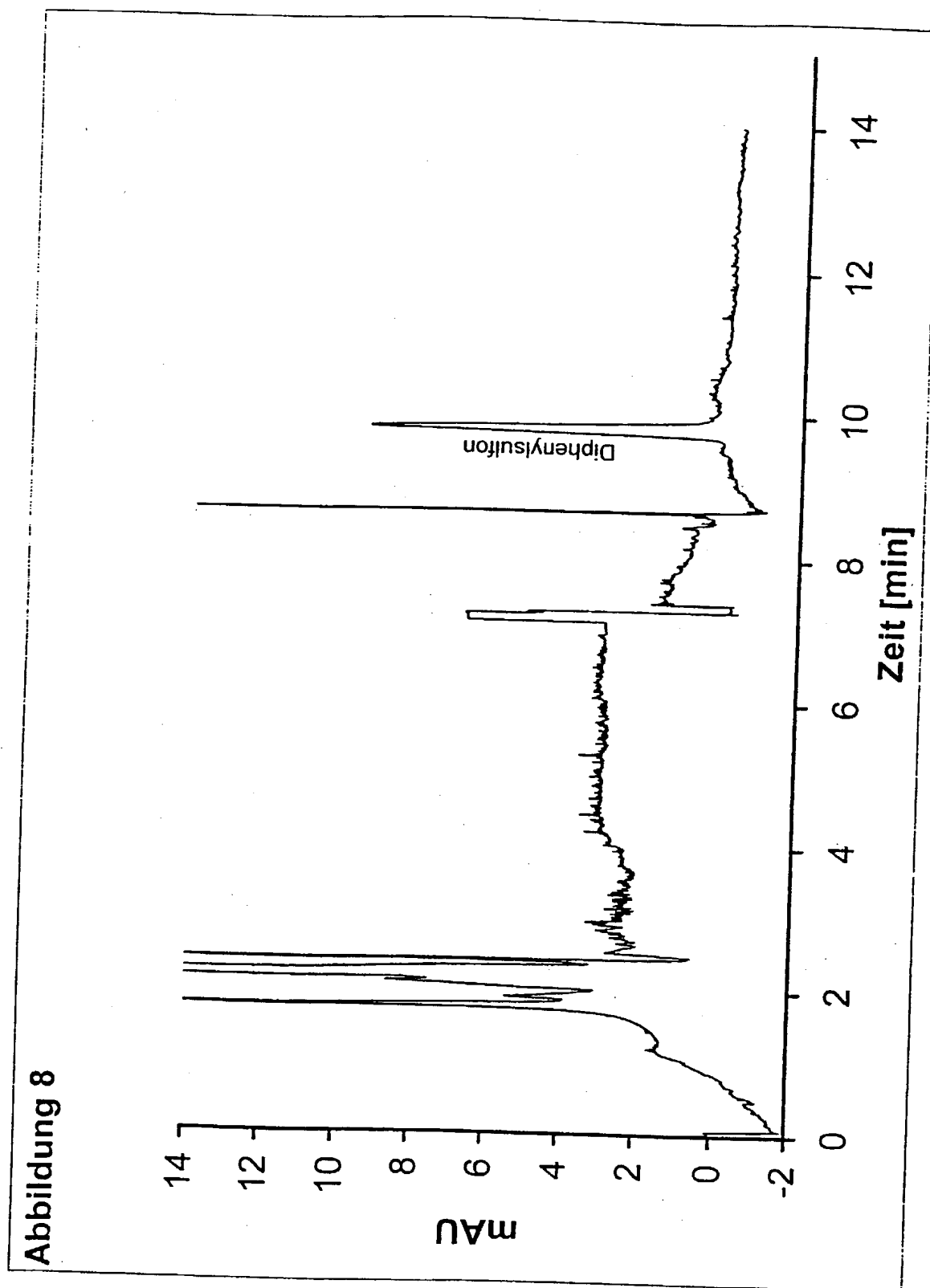


Abbildung 7





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N30/48 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 431 807 A (SMIGOL VLADIMIR ET AL) 11 July 1995 (1995-07-11) column 9, line 24 -column 10, line 36	1,2
A	US 5 869 152 A (COLON LUIS A) 9 February 1999 (1999-02-09) column 5 -column 6	1,2
A	NARANG P ET AL: "Sol-gel-derived fluorinated stationary phase for open tubular electrochromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 773, no. 1-2, 27 June 1997 (1997-06-27), pages 65-72, XP004125493 ISSN: 0021-9673 the whole document	1,2

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2000

Date of mailing of the international search report

26/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01391

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 813 062 A (BIO RAD LABORATORIES) 17 December 1997 (1997-12-17) column 1, line 21-24 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5431807 A	11-07-1995	US 5316680 A	31-05-1994
		WO 9408686 A	28-04-1994
US 5869152 A	09-02-1999	NONE	
EP 0813062 A	17-12-1997	US 5647979 A	15-07-1997
		AU 702340 B	18-02-1999
		AU 2476697 A	18-12-1997
		DE 813062 T	13-08-1998
		JP 2854295 B	03-02-1999
		JP 10067811 A	10-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01391

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N30/48 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ¹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 431 807 A (SMIGOL VLADIMIR ET AL) 11. Juli 1995 (1995-07-11) Spalte 9, Zeile 24 - Spalte 10, Zeile 36	1,2
A	US 5 869 152 A (COLON LUIS A) 9. Februar 1999 (1999-02-09) Spalte 5 - Spalte 6	1,2
A	NARANG P ET AL: "Sol-gel-derived fluorinated stationary phase for open tubular electrochromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 773, Nr. 1-2, 27. Juni 1997 (1997-06-27), Seiten 65-72, XP004125493 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument	1,2
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

¹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/06/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nternationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01391

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EP 0 813 062 A (BIO RAD LABORATORIES) 17. Dezember 1997 (1997-12-17) Spalte 1, Zeile 21-24 -----</p>	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5431807 A	11-07-1995	US 5316680 A WO 9408686 A	31-05-1994 28-04-1994
US 5869152 A	09-02-1999	KEINE	
EP 0813062 A	17-12-1997	US 5647979 A AU 702340 B AU 2476697 A DE 813062 T JP 2854295 B JP 10067811 A	15-07-1997 18-02-1999 18-12-1997 13-08-1998 03-02-1999 10-03-1998